



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 38/17</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/51627</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月8日(08.09.00)</p>						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01291</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月3日(03.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平11/56992</td> <td>1999年3月4日(04.03.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/56993</td> <td>1999年3月4日(04.03.99)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) セーレン株式会社(SEIREN CO., LTD.)(JP/JP) 〒918-8003 福井県福井市毛矢1丁目10番1号 Fukui, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>佐々木真宏(SASAKI, Masahiro)(JP/JP)</p> <p>山田英幸(YAMADA, Hideyuki)(JP/JP)</p> <p>野村正和(NOMURA, Masakazu)(JP/JP)</p> <p>〒918-8003 福井県福井市毛矢1丁目10番1号 セーレン株式会社内 Fukui, (JP)</p> <p>(74) 代理人 斉藤武彦, 外(SAITO, Takehiko et al.) 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目1番8号 赤坂大成ビル Tokyo, (JP)</p>		特願平11/56992	1999年3月4日(04.03.99)	JP	特願平11/56993	1999年3月4日(04.03.99)	JP	<p>(81) 指定国 BR, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平11/56992	1999年3月4日(04.03.99)	JP						
特願平11/56993	1999年3月4日(04.03.99)	JP						
<p>(54)Title: FUNCTIONAL ORAL PREPARATIONS</p> <p>(54)発明の名称 機能性経口剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Novel hardly digestive additives for foods and drinks, auxiliary health products and preventives for colon cancer which have an effect of promoting mineral absorption in addition to a diet effect and an effect of treating constipation. Sericin or its hydrolysate is used in additives for foods and drinks, auxiliary health products or preventives for colon cancer.</p>								

ダイエット効果・便秘解消に加えてミネラル吸収促進作用を有する新規な難消化性飲食品添加物及び健康補助剤品並びに大腸ガン予防剤を提供する。

セリシン又はその加水分解物を飲食品添加物又は健康補助剤又は大腸ガン予防剤として用いる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TC トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ		TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ベトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明 細 書

機能性経口剤

〔発明の詳細な説明〕

〔技術背景〕

本発明は機能性経口剤に関し、特に難消化性の飲食品添加物、健康補助剤及び／又は大腸ガン予防剤として有用な機能性経口剤に関する。

〔従来技術〕

人の消化酵素で消化されない成分である食物繊維は、食生活の欧米化に伴い摂取量が年々減少している。しかしその一方で、その低カロリー性、血糖値の改善、便秘解消などの効果が見直されてきている。さらに近年の美容、健康への関心の高まりにより、実に様々な食物繊維を含んだ食品・飲料が提案、市販されている。

例えば特開平7-313120号公報には、低分子化したコンニャクマンナンからなる食物繊維を含む飲料が提案されている。

その他にも特開平5-199849号公報にはキノコ類から得られたもの、特開平6-169724号公報には低分子ペクチン、特開平2-303468号公報にはアルギン酸類など、実に多数の食物繊維が提案されている。

現在飲食品用として使用されている多くは水溶性の食物繊維である。この種の食物繊維はゲル化しやすい性質を持ち、粘性が高いため、飲食物に添加するには低粘度化してやらねばならず、製造法が複雑になってしまう。また、摂取した場合には腹部に多量のガスが発生するなどの問題がある。

また、食物繊維は余分な糖やコレステロールなどを吸着し体外に排出するため、体に必要なビタミン、ミネラルまでも排出してしまうおそれがある。特に、カルシウムは日本人の摂取量が不足していると言われており、近年ミネラルの十分な摂取は関係する疾患のリスク回避の意味から極めて重要である。しかし、安易に特定のミネラルばかりを大量に摂取することは効率的な補給方法といえないばかりか、他のミネラルの吸収が阻害されるなど新たな栄養的問題を引き起こす危険性もある。従って、栄養のバランスのよく考慮された食事を通じて摂取された点からのミネラル吸収促進作用は重要な問題となる。

一方、日本における死因のトップはガンである。なかでも、大腸ガン（直腸ガン＋結腸ガン）の占める割合が高く、将来この傾向はますます強まり、21世紀には胃ガンを追い抜くものと予想されている。

大腸ガンの発生には環境的因子が大きく関わっていると考えられ、その因子の一つが食生活の急激な欧米化である。動物性の脂肪やタンパク質を中心とする食生活では、肉類の消化・吸収のために発ガン性物質を生成するといわれる多量の胆汁酸を分泌しなければならないからである。

また、発ガンの因子として近年注目されているのがフリーラジカル、活性酸素である。これらは、熱、光、喫煙や排気ガス、紫外線などといった環境的因子を体内に取り込むことにより発生し、また体内で生理的に発生することも知られている。そして、このフリーラジカル、活性酸素が生体膜、組織を構成する脂質、タンパク質、核酸を攻撃して酸化反応を起こし、それによる障害が蓄積して、ついには発ガンに結びつくと考えられている。

大腸ガンは早期に発見すれば完全に治療することができると言われている。しかし進行する前のポリープの段階では発見することが難しく、これら発ガン性物質を、体内に取り込まない、あるいは速やかに体外に排出するための様々な試みがなされてきた。

そこで近年話題になっているのが食物繊維である。食物繊維とは「人の消化酵素で消化されない成分」を一括して称しており、食物として摂取されることにより糞便量を増加させ、腸管のぜん動運動を亢進させるので、腸内内容物の腸内通過時間を短縮させ、大腸内で生成される腐敗産物や発ガン性物質の量を減少させるものと考えられている。また、腐敗産物や発ガン物質が腸管膜と接触する時間が短縮することによって発ガンが抑制される可能性もある。水不溶性食物繊維と水溶性食物繊維に大別され、水不溶性食物繊維としてはセルロース、リグニン、ヘミセルロースA、ヘミセルロースC、キチン、コラーゲン等があり、水溶性食物繊維としてはペクチン、コンニャクマンナン、アルギン酸ナトリウム、カラゲenan、寒天、カルボキシメチルセルロース、難消化性デキストリン、ポリデキストロース等が例示される。しかしながら、食物繊維の種類によりその効果は様々であり、また、非栄養成分であるだけでなく、過剰摂取により腹部の充満感や

下痢を伴う等、多くの課題を抱えている。

さらに食物繊維以外の大腸ガン予防物質としてポリフェノール等の抗酸化剤が報告されているが、これらは日常の生活で摂取するのは極めて困難な量を必要とするため、現時点で大腸ガン予防剤の多くは食物繊維を有効成分としている。

〔発明の目的〕

本発明の目的は上記した従来技術の問題点を解決した機能性経口剤を提供することにある。

本発明の更なる目的は、ダイエット効果・便秘解消に加えてカルシウム、鉄、マグネシウム、亜鉛などのミネラルの吸収促進作用を有する新規な難消化性飲食品添加物及び健康補助剤を提供することにある。

本発明の更なる目的は、安全でかつ低濃度で優れた大腸ガン予防効果を有し、日常の食生活に適宜取り入れて無理なく摂取できる新規大腸ガン予防剤を提供することにある。

〔発明の要約〕

本発明者等はセリシン及びその加水分解物が体内の消化酵素に対して消化性が低く、ダイエットや便秘解消に効果的であると共にカルシウムなどのミネラルの吸収を促進するという特有の効果を持ち、それ自身の経口摂取により、又はそれを飲食品に添加して摂取することにより、優れたダイエット効果、便秘解消効果及びカルシウム吸収促進効果を得ることができることを見出した。

また本発明者等はセリシン及びその加水分解物が、低濃度で大腸ガンの予防に有効であることを見出し、本物質を有効成分とする安全性の高い、優れた大腸ガン予防物質を得ることに成功した。

従って、本発明はセリシン及び／又はその加水分解物からなる飲食品添加物、健康補助剤及び／又は大腸ガン予防剤として有用な機能性経口剤である。

〔発明の実施の形態〕

本発明において健康補助剤とは、飲食品に添加することなく、それ自身を直接又は担体に担持した状態等で経口摂取して、上記したダイエット効果、便秘解消効果及び／又はミネラル吸収促進効果を発現させるような使用態様をいう。

本発明で用いるセリシンとしては通常、繭又は生糸由来のセリシンが好ましく

用いられる。非加水分解物としてのセリシンは、菌又は生糸から一般的に行われる抽出方法で得ることができる。例えば以下のようにして純度90%以上の高精製度単一タンパク質の状態で抽出できる。

即ち、菌又は生糸に含有されるセリシンを水によって抽出し、例えば次の(1)、(2)のいずれかの方法で回収する。

(1) メタノール、エタノール、ジオキサン等の水溶性有機溶媒を混合してセリシンを析出させた後、これを濾別乾燥して、セリシン粉体として得る。

(2) 特開平4-202435号公報に提案されているように、限外濾過膜もしくは逆浸透膜に付した後、乾燥することによりセリシン粉体を得る。

またセリシンの加水分解物は、菌又は生糸から一般的に行われる抽出方法で得ることができる。

即ち、菌又は生糸に含有されるセリシンを、電気分解した水や、酸、アルカリもしくは酵素などによって部分加水分解して抽出してから、例えば同様に上記(1)、(2)のいずれかの方法で回収する。

菌はその良質なタンパク質が注目され、粉碎するなどして栄養源として食品に添加することが提案されているが、その菌タンパク質の一つであるセリシンが体内の消化酵素に対して消化性が低く、ダイエットや便秘解消に効果的であるということは全く知られていない。

難消化性であるセリシンは、腸内の活動を活発化させ、便の大腸通過時間を短縮させる働きがあり、有害・有毒物質を速やかに体外に排出させる。また余分な糖や脂質などを吸収しにくくするなど、食物繊維のような作用を示す。

このような直接的な効果だけでなく、吸収した水分により排便がスムーズになるなどの効果も有している。

さらにセリシンはミネラルとの結合能を有しており、ミネラル吸収を促進することがわかった。胃などで消化されにくいセリシンは、ミネラルと結合したまま腸内に到達し、そこでミネラルが吸収されるのを助ける働きをするのではないかと考えられる。本発明に用いられるミネラルとしては、カルシウム、鉄、マグネシウム、亜鉛、マンガン、銅、クロム、セレン、モリブデン、コバルト、ニッケル、砒素、沃素、ホウ素、臭素、フッ素、鉛、リチウム、珪素、バナジウム、カ

ドミウムなどの生体に必要な元素であれば特に限定されるものではない。

このセリシンは天然物由来であるため人体への安全性が高く、一般食品、一般飲料、さらには健康食品、特定保険用食品などの特別用途食品、その他経口摂取する適宜のもの（これらを本発明では飲食品と総称する）に添加して用いることができ、日常の食生活において無理なく摂取可能である。さらに水に可溶であるため、飲食品に添加しやすく様々な形状とすることができる。また、予め必要な前記に例示したようなミネラルの1種又は2種以上をバランスよく配合することによって、より効率的にミネラルを摂取することもできる。

健康補助剤として用いる場合もその形状は特に制限はなく、例えば粉末状、溶液状、ゲル状、スティック状、顆粒状、カプセル状、錠剤で用いる。

摂取量も無毒性故特に制限はなく、通常1日の摂取量は1～30g程度である。

。

大腸ガン予防剤として用いる場合もその形状には特に制限はなく、その剤型としては、溶液状、ゲル状、スティック状、顆粒状、錠剤、また大腸において効率よくその作用を発現させるためにカプセル状等としてもよく、その剤型は様々である。その投与量も前記したように無毒性故特に制限はないが、通常は1日体重kg当たり1mg～1g程度で十分である。

〔実施例〕

次に実施例により本発明を例証する。

〔製造例1〕 セリシン粉体の製造

菌1kgを水50L（リットル）中で95℃にて2時間処理し、セリシンを抽出した。得られた抽出液を平均孔径0.2μmのフィルターで濾過し、凝集物を除去した後、濾液を逆浸透膜により脱塩し、濃度0.2%の無色透明のセリシン水溶液を得た。この水溶液をエバポレーターを用いてセリシン濃度約2%にまで濃縮した後、凍結乾燥を行って、純度95%以上、平均分子量100,000のセリシン粉体（以下セリシンH）100gを得た。

〔製造例2〕 セリシン加水分解物粉体の製造

菌1kgを0.2%炭酸ナトリウム水（pH11～12）50L中で95℃にて2時間処理し、セリシン加水分解物を抽出した。得られた抽出液を平均孔径0

2 μ mのフィルターで濾過し、凝集物を除去した後、濾液を逆浸透膜により脱塩し、濃度0.2%の無色透明のセリシン加水分解物抽出液を得た。この抽出液をエバポレーターを用いてセリシン濃度約2%にまで濃縮した後、凍結乾燥を行って、純度90%以上、平均分子量20,000のセリシン加水分解物粉体（以下セリシンL）100gを得た。

〔試験例1〕消化性試験

消化試験の試料としてセリシンLまたはカゼインを用い、各試料濃度が0.5%（pH2.0）溶液になるように塩酸を用いて調製し、蒸留水で100mlに合わせた。胃の消化酵素であるペプシン（シグマ社）5mg試料溶液に加え、37℃で24時間インキュベートし、適時にサンプリングを行った。インキュベート終了後、試料溶液100mlを0.1%（pH8.5）になるよう炭酸水素ナトリウムを用いて調製した。その後、十二指腸の消化酵素であるパンクレアチン（シグマ社）を2mg加え37℃で24時間インキュベートを行った。

ペプチドの濃度測定はTNBS（2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸）法を用いて行った。サンプリングは全て0.5mlを採取し、30%TCA（トリクロロ酢酸）を0.1ml加え、遠心分離後、上清100 μ lに7%炭酸水素ナトリウムを3ml、0.1%TNBSを2ml加えて、37℃で2時間加温し、420nmの吸光度を測定した。

結果を図1、図2に示した。本試験では体内での消化酵素であるペプシンやパンクレアチンに対する影響を試験管内で確認した。TNBS法はタンパク質のアミノ末端と反応し、消化酵素で分解され易いほど、ペプチドが多く存在するためTNBS試薬との反応性が高まる。つまり値が高いほど消化酵素に対して分解されやすいことになる。カゼインに比べてセリシンはペプシン、パンクレアチンのいずれの消化酵素でも難消化性であることが確認された。

〔試験例2〕消化管輸送能試験

実験動物として、5週令の雄ICR系マウスを用いた。1群当たり10匹とし室温を24 \pm 1℃に保ち、12時間ごとの明暗交替（8:00～20:00は明、20:00～翌8:00は暗）の環境下で飼育を行った。予備飼育として1週間、市販の固形試料（MF、オリエンタル酵母（株））を与えた。試験日前日、

終夜絶食させた後、1時間摂食させ摂食量がほぼ一定の動物を選別し、1群8匹として実験に用いた。消化管輸送能のマーカースとしてBTB（投与量：0.3%溶液を1匹当たり0.35ml）を経口投与し、同時にセリシンL（投与量：2g/体重kg）またはコントロール（カゼイン、投与量：2g/体重kg）を経口投与した。投与後25時間まで経時的に糞を採取した。この間、6時間及び23時間後に各1時間ずつ摂食させた。糞のBTB排泄量を測定した後、糞を24時間減圧乾燥し糞乾燥重量を測定した。なお有意差の判定にはStudentのt-検定を用いた。

その結果、セリシン群は糞重量がコントロール群に比べて有意に増加していた（図3）。糞の性状はコントロール群に比べてやや大きく、柔らかめであったが、水様便、粘液便などの下痢症状は見られなかった。

またコントロール群で摂食後、2～4時間で糞中にBTBが見出され始め、6時間までにBTB総投与量の33.5%、8時間までに53.5%、25時間までに88.3%が排泄された。一方セリシン群では摂食後4～8時間のBTB排泄率がコントロール群に比べて有意に高く、セリシンは消化管輸送速度を高める効果を確認した（図4）。

〔試験例3〕便秘改善効果試験

実験動物として3週令の雄Sprague-Dawley系ラット（日本LSC（株））を用い、1群13匹とした。1匹ずつ金属ケージに入れ、室温を24±1℃に保ち、12時間ごとの明暗交替の環境下で飼育を行った。予備飼育として2週間、市販の固形試料（MF、オリエンタル酵母（株））を与えた後、セリシン群、コントロール群の2群に分け、実験食（表1）で7日間飼育を行った。なお1群は14匹とし、食事時間は全て14：00～17：00に限定した。実験食開始から7日目の17：00に、各群を平均体重が等しくなるように2つのグループに分け、それぞれアトロピン塩酸塩（0.5mg/体重kg）または生理食塩水を腹腔内注射により投与した。注射後6時間（17：00～23：00）の糞を採取し、減圧乾燥後、乾燥重量とした。なお有意差の判定にはDuncanの多重比較検定を用いた。

ヒトの便秘の多くは機能性便秘である。これは腸管平滑筋が副交感神経からア

セチルコリンの遊離が減少することで、消化管運動や肛門機能を抑制した結果生じる便秘である。実験に用いたアトロピンはナス科のベラドンナから得られるアルカロイドに由来し、副交感神経遮断薬として用いられる為、アセチルコリン及びアセチルコリン様薬物の可逆的拮抗物質として機能性便秘を誘導する。

表2の結果より、セリシンはアトロピン投与によって低下した消化管機能の改善が認められたことから、セリシンの便秘改善効果を確認した。

表1

飼料の組成 (100g 当たり)

	コントロール群	セリシン群
カゼイン	25.0	20.0
セリシンL	—	5.0
L-シスチン	0.1	0.1
コーン油	10.0	10.0
ミネラル混合	3.5	3.5
ビタミン混合	1.0	1.0
酒石酸コリン	0.2	0.2
セルロース	5.0	5.0
しょ糖	20.0	20.0
コーン澱粉	35.2	35.2

表2

	生理食塩水		アトロピン	
	コントロール群	セリシン群	コントロール群	セリシン群
摂食量(g/1d)	15.0±0.6	16.1±0.8	16.2±0.7	15.5±0.3
糞重量(g)	0.59±0.06 ^{a,b}	0.78±0.11 ^a	0.32±0.08 ^b	0.71±0.12 ^a
乾燥糞重量(g)	0.46±0.05 ^{a,b}	0.51±0.05 ^a	0.21±0.06 ^b	0.42±0.06 ^{a,b}
水分含量(%)	23.3±2.1 ^b	39.4±3.2 ^a	24.5±3.4 ^b	36.3±2.8 ^a

平均±SE, a, bは有意差有り (P<0.05)

a bは有意差なし

〔試験例 4〕 脂肪蓄積抑制効果試験

実験動物として5週令の雄 ICR 系マウス（日本 L S C（株））を用いた。1 群 12 匹とし、表 3 に示す飼料及び水を自由摂取させ、室温を $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保ち、12 時間ごとの明暗交替の環境下で 8 週間飼育を行った。試験終了後マウスを屠殺、解剖し、体重および腎付着脂肪重量を測定した。脂肪は体重当たりの腎付着脂肪重量割合を算出し、これを腎付着脂肪率とした。さらに血液から常法により血清を得て、トリグリセライド測定キット（トリグリセライド G-テストワークス 和光純薬工業（株））を用いて血清中のトリグリセライド濃度を測定した。なお有意差の判定には D u n c a n の多重比較検定を用いた。

結果を表 4 に示した。各群の食事摂取量には有意差が見られなかったが、コントロール群に比べてセリシン群はセリシンの添加量に伴って、体重の抑制が確認された。さらにセリシン群では腎付着脂肪率も抑制し、血清中のトリグリセライド濃度も低下したことから、セリシンは脂肪の蓄積を抑制していることが確認された。

表 3

飼料の組成（100g 当たり）

	コントロール群	セリシン1%	セリシン3%	セリシン5%
カゼイン	25.0	20.0	20.0	20.0
セリシンL	—	1.0	3.0	5.0
L-シスチン	0.1	0.1	0.1	0.1
コーン油	10.0	10.0	10.0	10.0
ミネラル混合	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合	1.0	1.0	1.0	1.0
酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2
セルロース	5.0	5.0	5.0	5.0
しょ糖	20.0	20.0	20.0	20.0
コーン澱粉	35.2	35.2	35.2	35.2

表 4

	コントロール群	セリシン1%	セリシン3%	セリシン5%
摂食量(g/1d)	4.93±0.13	5.03±0.21	5.11±0.17	4.98±0.14
最終体重(g)	44.3±0.6 ^a	43.1±0.4 ^{a,b}	42.5±0.6 ^b	41.5±0.3 ^b
腎臓付着				
脂肪率(%)	3.77±0.26 ^a	3.67±0.27 ^{a,b}	3.21±0.31 ^b	3.02±0.20 ^b
血清中性脂肪				
(mmol/L)	1.01±0.03 ^a	0.96±0.04 ^{a,b}	0.91±0.05 ^b	0.90±0.04 ^b
平均±SE, a, bは有意差有り (P<0.05) a bは有意差なし				

〔試験例5〕 ミネラル吸収促進効果試験

実験動物として8週令の雄Sprague-Dawley系ラット（日本LSC（株））を用いた。1群8匹とし、表5に示す飼料及び水を自由摂取させ、室温を24±1℃に保ち、12時間ごとの明暗交替の環境下で飼育を行った。飼育開始から10日後に各ラットを代謝ゲージに入れ、3日間の摂食量と糞排泄量を測定した。さらに糞中に排泄されたミネラル量を原子吸光光度計（Z-8000 日立（株））を用いて測定し、糞中のミネラル含有率を求めた。なお見かけの吸収率は以下の式で求めた。

$$\text{ミネラル吸収率(\%)} = [(\text{ミネラル摂取量} - \text{糞中ミネラル量}) / \text{ミネラル摂取量}] \times 100$$

その結果を表6に示す。セリシン添加によりミネラルのみかけの吸収率を有意に促進したことから、セリシンのミネラル吸収促進作用を確認した。

表 5

飼料の組成（100g当たり）

	コントロール群	セリシン群
カゼイン	23.0	20.0
セリシンL	—	3.0
L-シスチン	0.1	0.1

コーン油	1 0 . 0	1 0 . 0
ミネラル混合	3 . 5	3 . 5
ビタミン混合	1 . 0	1 . 0
酒石酸コリン	0 . 2	0 . 2
セルロース	5 . 0	5 . 0
しょ糖	2 0 . 0	2 0 . 0
コーン澱粉	3 7 . 2	3 7 . 2

表 6

	コントロール群	セリシン群
摂食量(3days/g)	45.5±1.3	46.2±1.1
乾燥糞重量(3days/g)	3.86±0.65	3.95±0.83
みかけの吸収率(%)		
カルシウム	57.0±0.8	65.2±2.5 **
マグネシウム	52.3±1.5	67.3±0.4 **
鉄	37.0±0.2	46.2±1.3 **
亜鉛	33.5±1.3	45.0±0.6 **

平均±S E, (** p < 0.01)

〔試験例 6〕大腸ガン予防効果試験

実験動物として、初体重 23～28 g の ICR 系雄マウス（日本チャールズリバー（株））を用い、1 群 12 匹とした。金網のある金属ケージに 4 匹ずつ入れ、12 時間明暗交替（8：00 AM～8：00 PM は明、8：00 PM～翌 8：00 AM は暗）の恒温（24±1℃）の動物室にて飼育した。1 週間、市販の固形飼料（オリエンタル酵母（株））を与えた後、実験食（表 7）に切り替え、35 日間飼育した。飼育開始から最初の 3 週間、計 3 回体重 K g 当たり 20 mg の 1, 2-ジメチルヒドラジンを皮下注射で投与した。飼育期間中は蒸留水と食餌を自由に与え、体重と摂食量を測定した（表 8）。

解剖は、動物を軽くジエチルエーテルで麻酔し、断頭により採血後、大腸をすばやく取り出した。大腸は切り開いてペーパータオル上に広げ、ホルマリン固定した。その後大腸を水洗し、0.1% (w/v) メチレンブルー中で5分間振盪し染色した。実体顕微鏡(40倍)で大腸表面を観察し、大腸の前ガン病変であるAberrant crypt foci (ACF) 数を観察した(表9)。なお有意差の判定にはDuncanの多重比較検定を用いた。

結果を表8, 9に示した。コントロールとセリシン各群では体重及び摂食量に有意差はなかったものの(表8)、ACFではセリシン群でその濃度に依存した、有意な低下が見られた。従ってセリシンが大腸の前ガン病変を抑制することが示された(表9)。

表7

	コントロール	1%セリシン	3%セリシン
カゼイン	23.0	22.0	20.0
セリシンH	—	1.0	3.0
L-シスチン	0.3	0.3	0.3
コーン油	10.0	10.0	10.0
ビタミン混合 (AIN-93)	1.0	1.0	1.0
塩混合 (AIN-93)	4.8	4.8	4.8
セルロース	5.0	5.0	5.0
しょ糖	20.0	20.0	20.0
コーン澱粉	35.9	35.9	35.9

表8

	摂食量 (g/日)	初期体重 (g)	最終体重 (g)
コントロール	4.4±0.2	26.3±0.4	36.2±0.6
1%セリシン	4.5±0.1	25.4±0.3	35.4±0.5
3%セリシン	4.4±0.3	25.8±0.3	36.5±0.3

(平均±SE)

表 9

	マウス数	1 匹当たりの A C F 数 (平均±S E)
コントロール	12	14.3±1.2
1%セリシン群	12	8.9±1.1 *
3%セリシン群	12	6.7±0.9 *

(* : $P < 0.05$)

〔試験例 7〕大腸ガン予防効果試験

本試験では試験例 6 に比べて飼育期間を 14 週間に延長しガンが形成するまで飼育を行い、セリシンの大腸ガン抑制に及ぼす効果を確認した。

実験動物として、初体重 23～28 g の I C R 系雄マウス（日本 S L C（株））を用い、1 群 40 匹とした。金網のある金属ケージに 4 匹ずつ入れ、12 時間明暗交替（8：00 AM～8：00 PM は明、8：00 PM～翌 8：00 AM は暗）の恒温（ $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）の動物室にて飼育した。1 週間、市販の固形飼料（オリエンタル酵母（株））を与えた後、実験食（表 7、ただしセリシン H の代わりにセリシン L を用いた）に切り替え、98 日間飼育した。飼育開始から最初の 10 週間、週 1 回体重 K g 当たり 10 m g の 1, 2-ジメチルヒドラジンを皮下注射で投与した。飼育期間中は蒸留水と食餌を自由に与え、体重と摂食量を測定した。

解剖は動物を軽くジエチルエーテルで麻酔し、断頭により採血後、大腸をすばやく取り出した。大腸は切り開いてペーパータオル上に広げ、ホルマリン固定した。その後大腸を水洗し、0.1% (w/v) メチレンブルー中で 5 分間振盪し染色した。実体顕微鏡（40 倍）で大腸表面を観察し、ガンの数を観察した。なお腫瘍発生率及びマウス 1 匹当たりの腫瘍数の有意差判定には、それぞれ D u n c a n の多重比較検定、 χ^2 -検定を用いた。

この結果、対照群とセリシン群では体重及び摂食量に有意差はなかったものの（表 10）、マウス 1 匹当たりのガンの数はセリシン摂取マウスの方が低い値を示した（表 11）。またガンを形成した割合も、セリシン摂取マウスの方が有意に低い値を示した。従ってセリシンは大腸ガンの形成を抑制することが示された。

。

表 1 0

	摂食量 (g/日)	初期体重 (g)	最終体重 (g)
コントロール	4.3±0.1	26.3±0.4	50.2±0.6
1%セリシン	4.5±0.1	25.1±0.3	49.3±0.5
3%セリシン	4.4±0.1	25.4±0.3	49.7±0.5
(平均±SE)			

表 1 1

	大腸ガン罹患 マウス (%)	大腸ガン数/マウス (平均±SE)
コントロール	36/40(90)	3.52±1.0
1%セリシン	27/40(68)*	1.89±0.5 *
3%セリシン	20/40(50)*	1.05±0.4 *
(* : P < 0.05)		

〔発明の効果〕

セリシンは難消化性であり、胃や腸の働きを活性化させ、胃や腸内で余分な水分やコレステロール、有害物質、中性脂肪などを吸収しにくくし、ダイエットや便秘解消に大いに役立つ。腸内でのまたカルシウム、鉄、マグネシウム、亜鉛、などのミネラル吸収促進剤としても有用である。

また天然物由来のタンパク質としての特性を持ち、生体内では高い安全性を有するので、たとえ大量に摂取したとしても無害である。さらに本発明品は無味、無臭であるため食品に添加した場合、官能特性に影響を与えない。従って、日常の食生活において無理なく摂取可能であり、その効果はいっそう顕著なものとなりうる。

大腸ガン予防剤としては、低濃度において大腸ガンの発生・成長の抑制に優れた効果を示す。

更に、本発明の有効成分であるセリシンは菌又は生糸の溶媒抽出物から、容易

にしかも単一のタンパク質としては高い純度で抽出できるため、安価に得られ、しかも水溶液の色が無色透明であるので、消色する必要が無く、複雑な処理工程を必要としないという大きな利点がある。

〔図面の簡単な説明〕

〔図 1〕

消化試験（対ペプシン）の結果を示すグラフ。

〔図 2〕

消化試験（対パンクレアチン）の結果を示すグラフ。

〔図 3〕

消化管輸送能を糞量で測定した結果を示すグラフ。

〔図 4〕

消化管輸送能を B T B 排泄率で測定した結果を示すグラフ。

請求の範囲

1. セリシン又は／及びその加水分解物からなることを特徴とする機能性経口剤。
。
2. 機能性経口剤が難消化性飲食品添加物である請求項 1 記載の機能性経口剤。
3. 機能性経口剤が健康補助剤である請求項 1 記載の機能性経口剤。
4. 機能性経口剤が大腸ガン予防剤である請求項 1 又は 3 記載の機能性経口剤。
5. ミネラル吸収剤として有用な請求項 1 又は 3 記載の機能性経口剤。
6. ミネラルを含有してなる請求項 1, 3 又は 5 記載の機能性経口剤。
7. セリシンが菌又は生糸から抽出した天然セリシンである請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載の機能性経口剤。

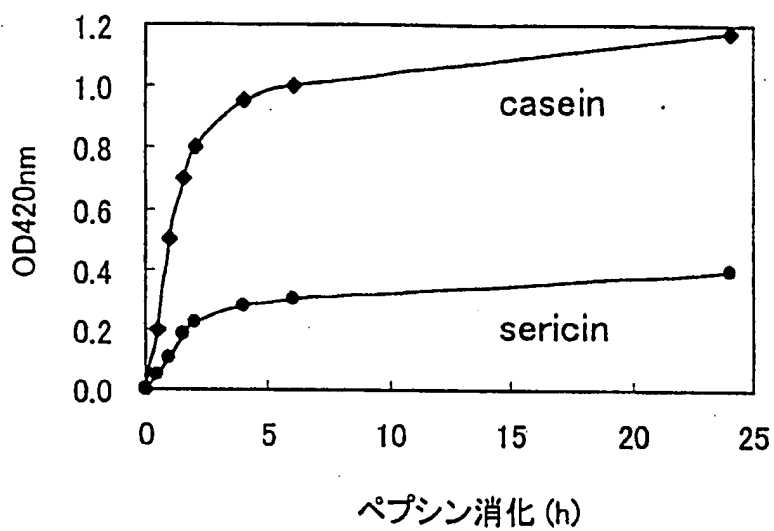


図 1

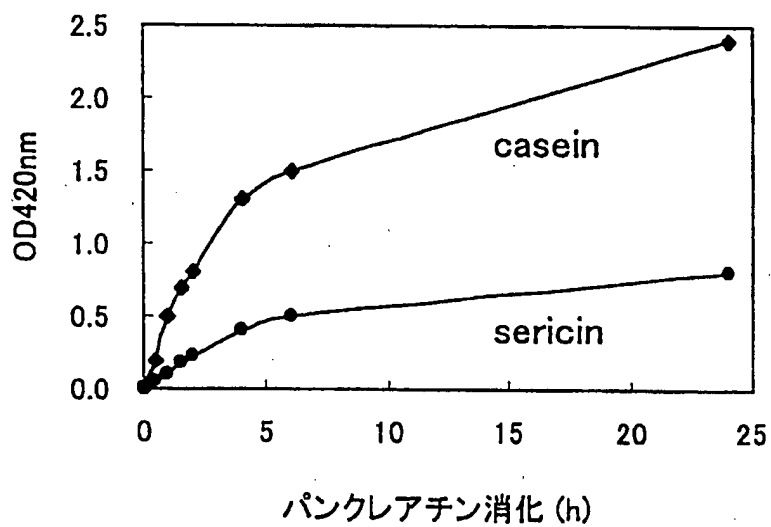


図 2

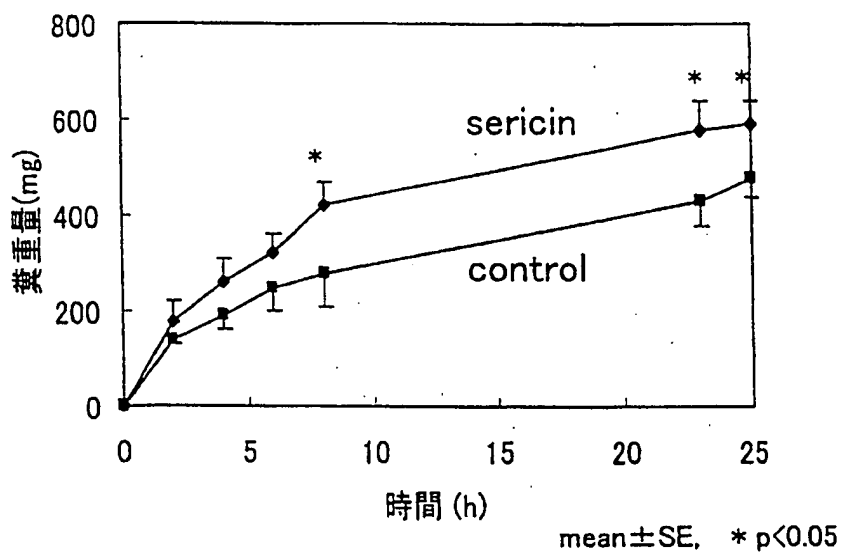


図3

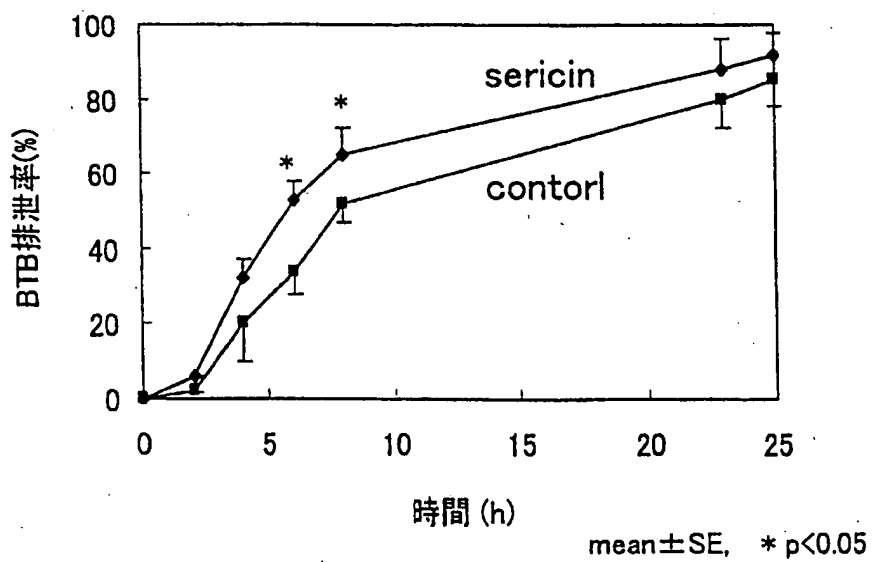


図4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN) EMBASE (ATN)
 MEDLINE (STN)
 BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Sadahiro SASAKI, "Dimethylhydrazine Yuhatsu Mouse Daichou Gan Hasshou ni Oyobosu Kinu Tanpaku shitsu Sericin no Eikyou", Journal of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry(JSBA), 5 March, 1999(05.03.99), Vol.73, Extra issue, p140,2p240D	1-4,6-7
X	JP, 1-256351, A (TERUMO CORORATION), 12 October, 1989 (12.10.89), Full text; Esp. claim 7 (Family: none)	1,3,6-7
Y	JP, 2-177864, A (TERUMO CORORATION), 10 July, 1990 (10.07.90), Full text; Esp. page 1, right column, lines 8-14 (Family: none)	1-4,6-7
Y	KANASHITA, Jun., et al, 'Buckwheat protein extract suppression of the growth depression in rats induced by feeding amaranth(Food Red No.2)', Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, Vol.60, No.9, pp1530-1531, Full text, Esp. page 1530, left column, lines 16-19	1-4,6-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search
 15 May, 2000 (15.05.00)

 Date of mailing of the international search report
 30.05.00

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01291

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAYASHITA, Jun., et al, 'Feeding of buckwheat protein extract reduces hepatic triglyceride concentration, adipose tissue weight, and hepatic lipogenesis in rat', Journal of Nutritional Biochemistry, 1996, Vol. 7, pp555-559, Full text, Esp. page 558, left column, line 32 to right column, line 19	1-4, 6-7
Y	S Kiriyaama et al., "Shin Eiyuu Kagaku", Kabushiki Kaisha Asakura Shoten, 1.March.1998 (01.03.98), pp95-106, Full text, Esp. page 99, lines 21-31	1-4, 6-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01291

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention as set forth in claim 5 pertains to mineral absorbents the pharmacological effect of which cannot be considered as being achieved based on the mechanism common to the preventives for colon cancer of inventions as set forth in claims 1 to 4.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-38/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)	EMBASE (ATN)
MEDLINE (STN)	
BIOSIS (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	佐々木真宏、「Dimethylhydrazine誘発マウス大腸癌発症に及ぼす絹タンパク質セリシンの影響」、日本農芸化学会誌、1999年3月5日、第73巻、臨時増刊号、p140、2p240D	1-4, 6-7
X	JP, 1-256351, A (テルモ株式会社)、12.10月、1989年 (12.10.89)、全文、特に特許請求の範囲7 (ファミリーなし)	1, 3, 6-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの。

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.05.00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 2-177864, A (テルモ株式会社)、10. 7月. 1990年 (10. 07. 90)、全文、特に第1頁右欄第8-14行 (ファミリーなし)	1-4, 6-7
Y	KANASHITA, Jun., <i>et al</i> , 'Buckwheat protein extract suppression of the growth depression in rats induced by feeding amaranth (Food Red No.2)', Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996年、第60巻、9号、pp 1530-1531、全文、特に第1530頁左欄第16-19行	1-4, 6-7
Y	KAYASHITA, Jun., <i>et al</i> , 'Feeding of buckwheat protein extract reduces hepatic triglyceride concentration, adipose tissue weight, and hepatic lipogenesis in rat', Journal of Nutritional Biochemistry, 1996年、第7巻、pp 555-559、全文、特に第558頁左欄第32行-右欄第19行	1-4, 6-7
Y	桐山修八 他、「新栄養化学」、株式会社朝倉書店、1. 3月. 1998 (01. 03. 98)、pp 95-106、全文、特に第99頁第21-31行	1-4, 6-7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項5に係る発明は、ミネラル吸収剤に関するものであり、請求項1-4に記載の発明であると認められる大腸癌予防剤と、共通のメカニズムによって薬理作用が奏されているとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。